



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

EP 04108144

REC'D 01 DEC 2004

WIPO

PCT

**BEST AVAILABLE COPY**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03016413.1

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Off

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:  
Application no.: 03016413.1  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 21.07.03  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Melkonian, Michael  
Jexmühle 10  
53797 Lohmar  
ALLEMAGNE  
Podola, Björn, Dipl.-Biol.  
Brabanter Strasse 41  
50672 Köln  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Verfahren und Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen  
sowie Biosensor mit kultivierten eukaryotischen Mikroorganismen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A01G/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PT RO SE SI SK TR LI

Bemerkungen:

Remarks:

Remarques:

The application was transferred from the above mentioned original applicant to:  
Algenion Gmbh & Co - Merzig/DE.  
The registration of the changes has taken effect on 24.06.04.

031301ep/HI/go

21. Juli 2003

**Verfahren und Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen  
Mikroorganismen sowie Biosensor mit kultivierten  
eukaryotischen Mikroorganismen**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen sowie einen Biosensor mit kultivierten eukaryotischen Mikroorganismen, bei denen es sich z. B. um Algen und insbesondere Mikroalgen und vorzugsweise Cyanobakterien handelt.

5

Eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, werden im Gegensatz zu prokaryotischen Mikroorganismen relativ selten in großtechnischen Anlagen zur Gewinnung von Biomasse mit wertvollen Inhaltsstoffen eingesetzt.

- 10 Bekannte Verfahren zur Produktion von Algen sind die Kultur in offenen Becken, in tubulären oder plattenförmigen Photobioreaktoren. Nachteile dieser Verfahren sind hohe Kosten für die Gewinnung von Algentrockenmasse aus der Mediensuspension, ungünstige Lichtverhältnisse innerhalb der Kulturen, hohe Kosten durch den zusätzlichen Einsatz von  $\text{CO}_2$ , das aufwändige Ernten der
- 15 kultivierten Algen und mechanische Belastung der Organismen durch die Medienzirkulation sowie beim Ernten. Bisher ist kein wirtschaftliches Kulturverfahren zur großtechnischen Produktion von Mikroalgen bekannt.

- Die in WO 97/11154 beschriebene Kultur von immobilisierten Algen auf
- 20 dünnen Schichten kann diese Probleme lösen. Hierzu werden Algen auf einem vertikal angeordneten Kunstfasergewebe immobilisiert. Durch einen laminaren Kulturmedienstrom wird der Gasaustausch zwischen Kultur und Umgebung erheblich beschleunigt, so dass keine zusätzliche  $\text{CO}_2$ -gabe erforderlich ist. Des weiteren ist die Lichtversorgung in dünnen Schichten effektiver. Die Biomasse
- 25 kann mit vergleichsweise geringem Wassergehalt geerntet werden, so dass der

Trocknungsprozess wesentlich kostengünstiger ist. Durch die Immobilisierung wird der mechanische Stress herabgesetzt, was bei der Kultur von empfindlichen Algen von Bedeutung ist. Probleme bei diesem bisherigen Verfahren zeigen sich vor allem bei dem mechanisch stark beanspruchenden Ernteprozess, der einen verstärkten Verschleiß des Kunstfasersubstrats zur Folge hat, wobei dessen Wiederverwendbarkeit stark herabgesetzt wird. Weitere Nachteile sind das Abtragen eines Teils der Organismen von dem Substrat durch die über dieses strömende Nährlösung und die Kontamination durch Mikroorganismen im Kulturmedium. Letzteres könnte man durch ein steriles Kulturmediumversorgungssystem entschärfen, was allerdings aufwändig ist.

Die EP-A-0 239 272 beschreibt eine Anlage zur Herstellung von Biomasse, insbesondere Algenbiomasse. Die Anzüchtung erfolgt dort in einer transparenten Röhre, die um eine senkrecht stehende Kernstruktur gewickelt ist.

Das der Erfindung zu Grunde liegende technische Problem ist die Verbesserung eines Kultivierungsverfahrens für eukaryotische Mikroorganismen sowie die Schaffung einer Vorrichtung, die ein verbessertes Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen ermöglicht.

Dieses Problem wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und einer Vorrichtung gemäß Anspruch 15, die in einer Ausgestaltung als Biosensor gemäß Anspruch 22 eingesetzt werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen weist die folgenden Schritte auf

- es wird ein perforierter Träger mit einer ersten Hauptfläche und einer zweiten Hauptfläche bereitgestellt, die für kultivierende Mikroorganismen geeignet ist.

- 3 -

- die wässrige Lösung tritt im wesentlichen mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche an die erste Hauptfläche des perforierten Trägers;
- die erste Hauptfläche des perforierten Trägers wird dadurch mit wässriger Lösung versorgt;
- 5 - die applizierten Mikroorganismen wachsen auf der ersten Hauptfläche.

Das die Erfindung darstellende neue Kultursystem für insbesondere Mikroalgen, Cyanobakterien oder andere Mikroorganismen basiert auf der funktionalen und konstruktiven Aufteilung einer zumindest zweilagig  
10 aufgebauten Schichtenfolge in eine Substratschicht, auf der sich die Algenkulturen befinden, und eine Versorgungsschicht, die der Zufuhr von Kulturmedium durch die Substratschicht hindurch dient.

Hierbei befindet sich die Versorgungsschicht als eine wässrige Lösung aufwei-  
15 sender Flüssigkeitsfilm auf der einen Hauptfläche der Substratschicht, während sich die zu kultivierenden Mikroorganismen auf der anderen Hauptfläche der Substrat- oder Trägerschicht befinden.

Der Vorteil der räumlichen Trennung des Flüssigkeitsfilms von den zu kultivie-  
20 renden Algen besteht unter anderem darin, dass nunmehr (kleine) Algen nicht mehr durch die Flüssigkeit von der Trägerschicht weggespült werden können. Die perforierte Trägerschicht fungiert ferner wie ein Filter, der zwar Flüssigkeit zu den Algen hindurchlässt, Mikroorganismen auf Grund der kleinstformatigen Perforation aber daran hindert, durch die Trägerschicht von deren einen  
25 Hauptfläche zu deren anderen Hauptfläche zu gelangen. Dadurch ist auch das Kontaminationsrisiko herabgesetzt. Schließlich lassen sich die kultivierten Mikroorganismen auf einfache Weise ernten, indem sie sich von derjenigen Hauptfläche der Trägerschicht, auf der sie kultiviert werden, abtragen lassen, ohne in den Systemaufbau eingreifen zu müssen. Allenfalls ist für die Dauer  
30 der Ernte die Zufuhr der wässrigen Lösung zu unterbrechen.

Die Versorgung der zweiten Hauptfläche mit der wässrigen Lösung, bei der es sich vorzugsweise um eine Nährstofflösung zur Kultivierung der eukaryotischen Mikroorganismen handelt, kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, so ist es z. B. möglich, dass die Trägerschicht vertikal herabhängend angeordnet wird und die eine Hauptfläche am oberen Ende der Trägerschicht mit der wässrigen Lösung versorgt wird, die auf Grund von Schwerkraft an dieser Hauptfläche der Trägerschicht nach unten strömt.

Alternativ ist es möglich, die Trägerschicht, wie bei Oberflächenbeschichtungssystemen für technische Anwendungen an sich bekannt (z. B. Folienbeschichtungsverfahren für z. B. Magnetbänder), über ein offenes Bad oder Becken zu bewegen, wobei lediglich die mit der wässrigen Lösung zu benetzende Hauptfläche der Trägerschicht in Kontakt mit der wässrigen Lösung gelangt; die dem Bad abgewandte mit Mikroorganismen versehene Seite der Trägerschicht kommt nicht in direkten Kontakt mit dem Bad.

Ein weiterer technischer Folienbeschichtungsprozess, der ebenfalls Anwendung im Zusammenhang mit der Erfindung finden kann, besteht darin, dass die wässrige Lösung über eine Schlitzdüse oder mehrere Einzeldüsen aus der Oberseite einer schiefen Ebene austritt, auf der sie dann bis zum am tiefsten gelegenen Rand fließt, um dort mit der einen Hauptfläche der an dem Rand der schiefen Ebene entlang bewegten Trägerschicht in Kontakt zu gelangen und von dieser "mitgenommen" zu werden. Hierbei können auch mehrlagig aufgebaute laminar strömende wässrige Lösungen eingesetzt werden und über der schiefen Ebene zur Trägerschicht gelangen.

Schließlich ist es auch möglich, die wässrige Lösung in Form eines "Flüssigkeitsstroms" auf die betreffende Hauptfläche der Trägerschicht auf-

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der perforierte Träger auf einer Verteilerschicht angeordnet. Es kann insbesondere auf der Verteilerschicht ein perforierter weiterer Träger angeordnet sein.

5

Der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte perforierte Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht sind insbesondere hydrophil.

- 10 Durch die Verwendung dieses Materials wird die Ernte bei gleichzeitig sehr geringer Beanspruchung des Materials erheblich vereinfacht und kostengünstiger. Die Verwendung einer nur für das Kulturmedium durchlässigen Trägerschicht in einem zweischichtigen System verhindert den Übergang der eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, in den Kulturmedienstrom.
- 15 Dadurch wird zum einen die Auswaschung der Organismen verhindert, wodurch eine erhöhte Biomasseproduktivität resultiert. Zum anderen entfallen kostenverursachende Aufreinigungsschritte des Kulturmediums. Bei der Verwendung einer für Mikroorganismen undurchlässigen Substratschicht können außerdem Kontaminationsrisiken für die Algenkulturen verringert
- 20 werden.

Der perforierte Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht besteht insbesondere aus organischen oder anorganischen Materialien.

- 25 Der perforierte Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht kann dabei insbesondere aus mineralischen Fasern, hydrophilen organischen Fasern oder Kombinationen davon aufgebaut sein.

- Als organisches Material kommt beispielsweise Papier, Celluloseester, insbesondere Celluloseacetat, Cellulosemischester, Cellulose, Cellulosenitrat, 30 Polyamide, Polyester, und/oder Polyolefine in Betracht.

Als anorganisches Material kommt zum Beispiel eine poröse Keramik und/oder Glasfasern in Betracht.

5 Erfindungsgemäß können nach der Kultivierung die Mikroorganismen vom perforierten Träger und/oder vom perforierten weiteren Träger durch Einwirkung mechanischer Kräfte wie Abschaben oder chemischer Behandlung wie Behandlung mit oberflächenaktiven Agenzien und/oder organischen Lösungsmitteln abgelöst werden.

10 In einer anderen Ausführungsform können die Mikroorganismen zusammen mit dem perforierten Träger geerntet werden. Dies kann sinnvoll sein, wenn die Mikroorganismen am Träger verbleibend aufgeschloßen werden, um Inhaltsstoffe beispielsweise durch Extraktion zu gewinnen. Die extrahierten Mikroorganismen oder Zelltrümmer können mit dem Träger mechanisch vom  
15 Extrakt getrennt werden.

In einer weiteren Ausführungsform können die Mikroorganismen durch Auffangen abgelöster Biomasse in fließendem Kulturmedium erhalten werden.

20 Die Mikroorganismen können insbesondere nach Trocknung vom porösen Träger abgelöst und danach aufgefangen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für Algen und Mikroalgen. Die Erfindung findet jedoch auch Anwendung bei der Kultivierung  
25 von Cyanobakterien.

Von der Vorrichtungssseite her ist die Erfindung in dem Doppelschichtaufbau



- 7 -

- wobei die eukaryotischen Mikroorganismen auf der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers kultivierbar sind und der perforierte Träger für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen im wesentlichen undurchlässig ist, und
  - 5 - einem eine wässrige Lösung aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche des Trägers steht,
  - wobei die wässrige Lösung mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche durch den perforierten Träger hindurch zur ersten Hauptfläche transportierbar ist.
- 10 Anstelle eines zweischichtigen Aufbaus ist es auch möglich, einen dreischichtigen Aufbau zu wählen. Dieser Aufbau ist durch zwei Trägerschichten charakterisiert, zwischen denen der Flüssigkeitsfilm unter Kontakt mit den einander zugewandten Hauptflächen der Träger angeordnet ist.
- 15 Damit sich die wässrige Lösung gleichmäßig über die zweite Hauptfläche der Trägerschicht verteilt, ist bei einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung eine (Flüssigkeits-)Verteilerschicht vorgesehen, die dem Film aus wässriger Lösung ausgesetzt ist und insbesondere durch diesen "getränkt" wird. Bei der
- 20 Verteilerschicht handelt es sich vorzugsweise um eine Kapillarkräfte quer zur Dickenerstreckung der Trägerschicht erzeugenden Schicht, die insbesondere als Flies aus vorzugsweise Kunststofffasern (z. B. sogenanntes Geotextil) ausgebildet sein kann. Die zweite Hauptfläche der Trägerschicht bzw. jede Trägerschicht steht in Kontakt mit der Verteilerschicht.
- 25 Im übrigen lässt sich die erfindungsgemäße Vorrichtung mit den Merkmalen der zuvor beschriebenen Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens kombinieren.
- 30 Neben der Verwendung als Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen lässt sich der erfindungsgemäße Zwei- bzw. Dreilagenaufbau

aber auch als Biosensor mit eukaryotischen Mikroorganismen einsetzen. Dieser Biosensor ist erfindungsgemäß versehen mit:

- einem perforierten Träger, der eine erste Hauptfläche und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche aufweist,
- 5 - wobei die eukaryotischen Mikroorganismen auf der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers kultivierbar sind und der perforierte Träger für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen im wesentlichen undurchlässig ist, und
- einem eine wässrige Lösung aufweisenden Film, der in Kontakt mit ledig-  
10 lich der zweiten Hauptfläche des Trägers steht,
- wobei die wässrige Lösung mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche durch den perforierten Träger hindurch zur ersten Hauptfläche transportierbar ist,
- wobei die Kultivierung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der  
15 wässrigen Lösung und/oder eines in Kontakt mit der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers stehenden Gases erfolgt.

Die auf einer der beiden Hauptflächen des Trägers kultivierbaren Mikroorganismen sind der Umgebung ausgesetzt. Ein Wachstum bzw. eine Degradation erfolgt in Folge der Zusammensetzung der wässrigen Lösung und/oder des in  
20 Kontakt mit den Mikroorganismen tretenden Gases. Auf diese Weise ist es beispielsweise möglich, die wässrige Lösung oder, allgemein ausgedrückt, einen wässrigen Lösungsstrom auf bestimmte Inhaltsstoffe hin zu untersuchen. Beispielsweise könnte man anhand des Wachstums bestimmter Mikroor-  
25 ganismen auf dem Träger feststellen, dass die auf der Rückseite entlangströmende wässrige Lösung bestimmte Inhaltsstoffe aufweist. Genauso ist es aber auch möglich, diese Detektion für das in Kontakt mit den Mikroorganismen

als auch des erfindungsgemäßen Biosensors Gegenstand der einzelnen Unteransprüche der Anspruchsfassung.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher  
5 erläutert. Im einzelnen zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Kultivierungsverfahrens für Algen auf Verbundschichten mit selektiver Permeabilität,

10 Fig. 2 eine vergrößerte Teildarstellung der Verbundschichtanordnung gemäß Fig. 1,

Fig. 3 die Anordnung der Verbundschichten zur Verwendung als Biosensor für Gase und

15

Fig. 4 die Anordnung der Verbundschichten als Verwendung des Biosensors für Flüssigkeiten.

Fig. 1 zeigt den grundsätzlichen Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung  
20 10 zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen und Mikroalgen. Anhand dieser Figur und der vergrößerten Teildarstellung in Fig. 2 wird auch das erfindungsgemäße Verfahren deutlich.

Ein in diesem Ausführungsbeispiel vertikal angeordnetes Verbundschichten-  
25 system 12 weist zwei Trägerschichten 14, 16 auf, zwischen denen eine wässrige Lösung 18 entlang strömt. Die beiden Trägerschichten 14 sind parallel zueinander angeordnet und weisen an ihren einander abgewandten außenliegenden ersten Hauptflächen 19 eukaryotische Mikroorganismen 20 auf. Die  
30 Strömung aus wässriger Lösung 18 (nachfolgend auch Flüssigkeitsfilm genannt) steht in Kontakt mit den einander zugewandten innenliegenden zweiten Hauptflächen 22 der beiden Trägerschichten 14. Mit Hilfe der wässrigen Lösung wird eine Verteilerschicht 23 versorgt, die ebenfalls zwischen den

beiden Trägerschichten 14 und 16 angeordnet ist. Diese Verteilerschicht 23 ist in diesem Ausführungsbeispiel als Vlies aus Kunststofffasern ausgebildet. Sie sorgt für die Verteilung der wässrigen Lösung über die zweiten Hauptflächen 22 der Trägerschichten 14, 16.

5

Die Versorgung des Verbundschichtensystems 12 mit wässriger Lösung erfolgt über eine Zuführleitung 24, über die mittels einer Pumpe 26 aus einem Reservoir 28 wässrige Lösung gepumpt wird. Der aus dem Verbundschichtensystem 12 abfließende Teil der wässrigen Lösung 18 gelangt über eine Ablaufleitung 30 zum Reservoir 28, so dass insgesamt eine Zirkulation der wässrigen Lösung gegeben ist. Dies ist jedoch für die Erfindung nicht zwingend erforderlich. Anstelle von Zu- und Ableitungssystemen können auch andere Leitungssysteme verwendet werden.

10

Die beiden Trägerschichten 14 sind als Membranfilter aus beispielsweise Cellulosemischester ausgebildet, die demzufolge perforiert sind. Aufgrund dieser Perforation ist es möglich, dass die wässrige Lösung 18 aufgrund von Kapillarkraftwirkungen von der zweiten Hauptfläche 22 durch die Trägerschichten 14 auf deren erste Hauptflächen 19 gelangt, wo sie zur Versorgung der Mikroorganismen 20 dient. Bei der wässrigen Lösung 18 handelt es sich also um eine Nährlösung für die Mikroorganismen 20.

20

Aufgrund der Filterwirkung der Trägerschichten 14 gelangen nun keinerlei zu kultivierende Mikroorganismen in die Nährmittellösung (wässrige Lösung 18). Sämtliche zu kultivierende Mikroorganismen verbleiben also auf der ersten Hauptfläche 19 einer Trägerschicht 14.

25

Durch die zuvor beschriebene Filterwirkung wird überdies verhindert, dass die Mikroorganismen 20 über die Nährmittellösung bzw. deren Strömung kontaminiert werden. So ist beispielsweise hierdurch die Gefahr der Entstehung und Ausbreitung von Pilzen bzw. Amöben oder anderen Kontaminationsorganismen deutlich herabgesetzt, die zur völligen Zerstörung der zu kultivierenden Mikroorganismen 20 führen kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren wurden anhand der Fig. 1 und 2 vorstehend für den Fall beschrieben, dass über einen Flüssigkeitsfilm (wässrige Lösung 18) direkt zwei einander gegenüberliegende und Mikroorganismen aufweisende perforierte Trägerschichten "versorgt" werden. Es ist aber auch denkbar, dass der Flüssigkeitsfilm lediglich an der Rückseite eines Trägers entlang strömt, dessen Vorderseite die zu kultivierenden Mikroorganismen aufweist.

In den Fig. 3 und 4 sind zwei alternative Anordnungen zur Verwendung der Vorrichtung gemäß Fig. 1 und 2 (in Zweischichtaufbau) als Biosensor dargestellt. Gemäß Fig. 3 ist die Vorrichtung 10 in einem Messraum 32 angeordnet, dem die mit Mikroorganismen 20 versehene erste Hauptfläche 19 des Verbundschichtensystems 12 ausgesetzt ist. Die Versorgung des Verbundschichtensystems 12 mit wässriger Lösung 18 (Nährmittellösung) erfolgt so, wie am Beispiel der Fig. 1 erläutert.

Je nach Zusammensetzung des Fluids, das in dem Messraum 32 angeordnet ist (Gas oder Flüssigkeit) verändert sich das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen 20. Indem unterschiedliche Mikroorganismen oder auch gleiche Mikroorganismen auf der Hauptfläche 19 der Trägerschicht 14 angeordnet sind, lässt sich anhand von deren Wachstumsverhalten auf die Zusammensetzung des Fluids schließen.

Fig. 4 schließlich zeigt den Fall, dass mittels des Verbundschichtensystems 12 die Zusammensetzung der wässrigen Lösung 18 sensiert werden kann.

- 12 -

- Beispielsweise kann auf diese Weise eine zu messende Strömung 34 einer Flüssigkeit sensiert werden. Von dieser Flüssigkeit 34 wird die als wässrige Lösung 18 auf der Rückseite (Hauptfläche 22) der Trägerschicht 14 entlang strömende wässrige Lösung 18 abgezweigt und stromab wieder zugeführt.
5. Anhand des Wachstums der Mikroorganismen 20 kann dann wiederum auf die Zusammensetzung der zu untersuchenden Flüssigkeit 34 geschlossen werden. Hierbei ist es ebenfalls möglich, dass unterschiedliche Mikroorganismen auf der Trägerschicht 14 angeordnet sind.

### ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, Mikroalgen und Cyanobakterien, wobei
  - ein perforierter Träger (14) mit einer ersten Hauptfläche (19) und einer zweiten Hauptfläche (22), der für eukaryotische Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist, bereitgestellt wird,
  - die Mikroorganismen (20) auf die erste Hauptfläche (19) appliziert werden,
  - die zweite Hauptfläche (22) mit einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film versehen wird,
  - die wässrige Lösung (18) im wesentlichen mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (22) an die erste Hauptfläche (19) tritt,
  - die erste Hauptfläche (18) dadurch mit wässriger Lösung (18) versorgt wird und
  - die applizierten Mikroorganismen (20) auf der ersten Hauptfläche (19) wachsen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der perforierte Träger (14), der weitere perforierte Träger (16) und/oder die Verteilerschicht (23) hydrophil ist/sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der perforierte Träger (14), der weitere perforierte Träger (16) und/oder die Verteilerschicht (23) mineralische Fasern, hydrophile organische Fasern, insbesondere organische oder anorganische Materialien, oder Kombinationen davon aufweist.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei nach der Kultivierung die Mikroorganismen vom perforierten Träger (14) und/oder vom weiteren perforierten Träger (16) durch Einwirkung mechanischer Kräfte wie Abschaben oder chemischer Behandlung wie Behandlung mit

- 14 -

oberflächenaktiven Agenzien und/oder organischen Lösungsmitteln abgelöst werden, die Mikroorganismen (20) zusammen mit dem perforierten Träger (14) geerntet werden, die Mikroorganismen (20) durch Auffangen abgelöster Biomasse in fließendem Kulturmedium geerntet werden und/oder wobei die Mikroorganismen (20) nach Trocknung vom porösen Träger (14) sich ablösen und danach aufgefangen werden.

5. Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, Mikroalgen und Cyanobakterien, mit

- einem perforierten Träger (14), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
- wobei die eukaryotischen Mikroorganismen (20) auf der ersten Hauptfläche (19) des perforierten Trägers (14) kultivierbar sind und der perforierte Träger (14) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist, und
- einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche (22) des Trägers (14) steht,
- wobei die wässrige Lösung (18) mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (22) durch den perforierten Träger (14) hindurch zur ersten Hauptfläche (19) transportierbar ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung (18) als über die zweite Hauptfläche (22) des Trägers (14) strömender Film ausgebildet ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, gekennzeichnet durch einen



- 15 -

- eukaryotischen Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist und
- wobei die zweiten Hauptflächen (22) beider Träger (14,16) einander zugewandt und durch den die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film voneinander beabstandet sind.
8. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sich in dem die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film eine die wässrige Lösung (18) über die zweite Hauptfläche (22) des oder jedes perforierten Trägers (14,16) verteilende Verteilerschicht (23) befindet.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerschicht (23) ein Vlies aus insbesondere Kunststofffasern, insbesondere ein Geotextil ist.
10. Biosensor mit eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, Mikroalgen und Cyanobakterien, mit
- einem perforierten Träger (14), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
  - wobei die eukaryotischen Mikroorganismen (20) auf der ersten Hauptfläche (19) des perforierten Trägers (14) kultivierbar sind und der perforierte Träger (14) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist, und
  - einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche (22) des Trägers (14) steht,
  - wobei die wässrige Lösung (18) mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (12) durch den perforierten Träger (14) hindurch zur ersten Hauptfläche (19) transportierbar ist,
  - wobei die Kultivierung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der wässrigen Lösung und/oder eines in Kontakt mit der ersten Hauptflä-

che (19) des perforierten Trägers (14) und/oder der Mikroorganismen (20) stehenden Fluids erfolgt.

11. Biosensor nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung (18) als über die zweite Hauptfläche (22) des Trägers (14) strömender Film ausgebildet ist.
12. Biosensor nach Anspruch 10 und/oder 11, gekennzeichnet durch einen weiteren perforierten Träger (16), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
  - wobei eukaryotische Mikroorganismen (20) auf der ersten Hauptfläche (19) des weiteren perforierten Trägers (16) kultivierbar sind und der weitere perforierte Träger (16) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist und
  - wobei die zweiten Hauptflächen (22) beider Träger (14,16) einander zugewandt und durch den die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film voneinander beabstandet sind.
13. Biosensor nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass sich in dem die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film eine die wässrige Lösung (18) über die zweite Hauptfläche (22) des oder jedes perforierten Trägers (14,16) verteilende Verteilerschicht (23) befindet.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerschicht (23) ein Vlies aus insbesondere Kunststofffasern, insbesondere aus Polyester, ist.

- 17 -

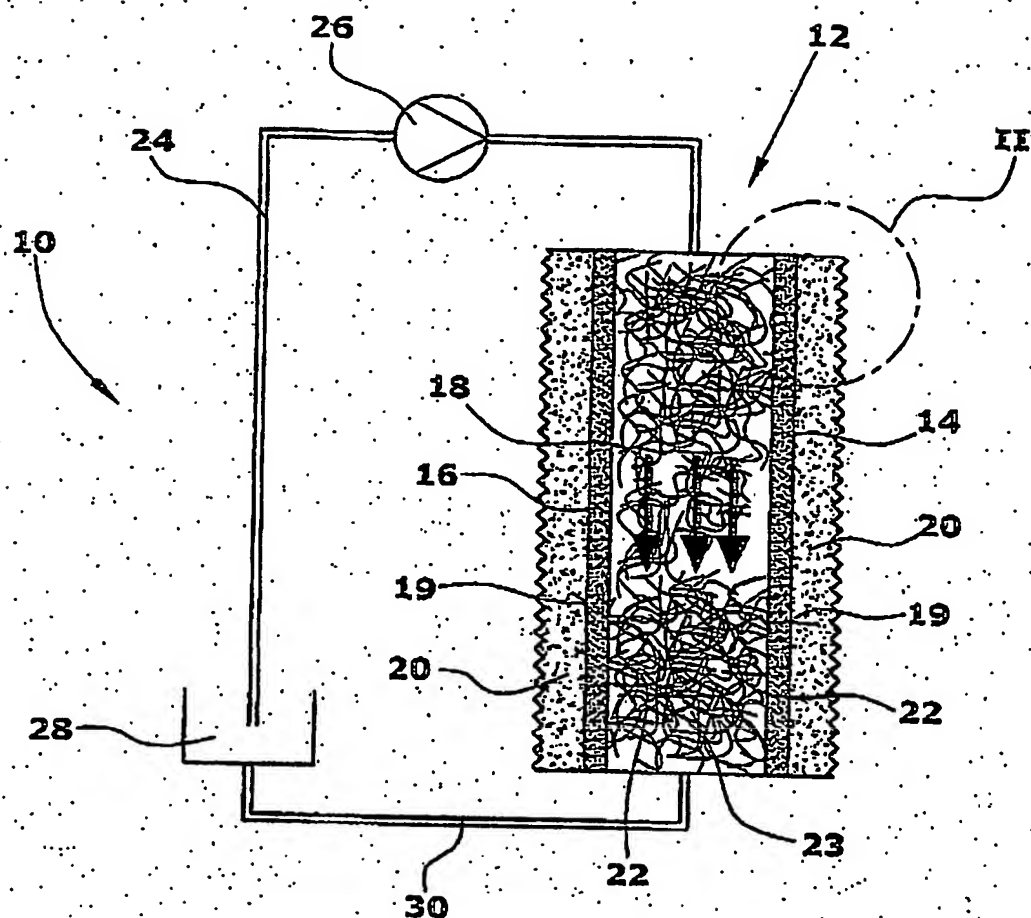
16. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der oder jeder perforierte Träger (14,16) und, falls vorhanden, die Verteilerschicht (23) hydrophil ist/sind.

## ZUSAMMENFASSUNG

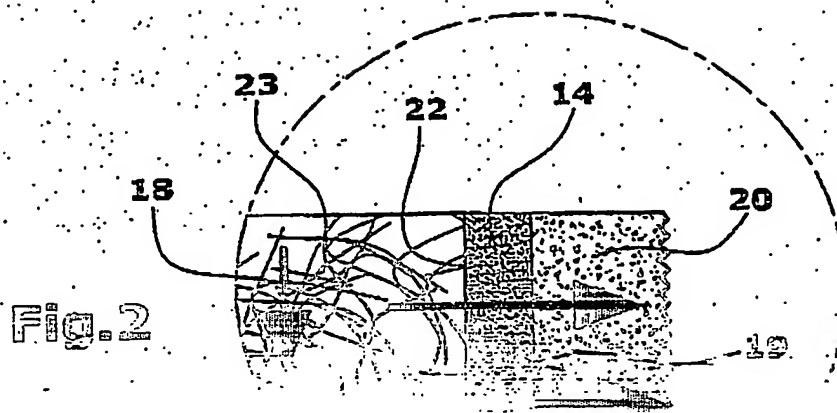
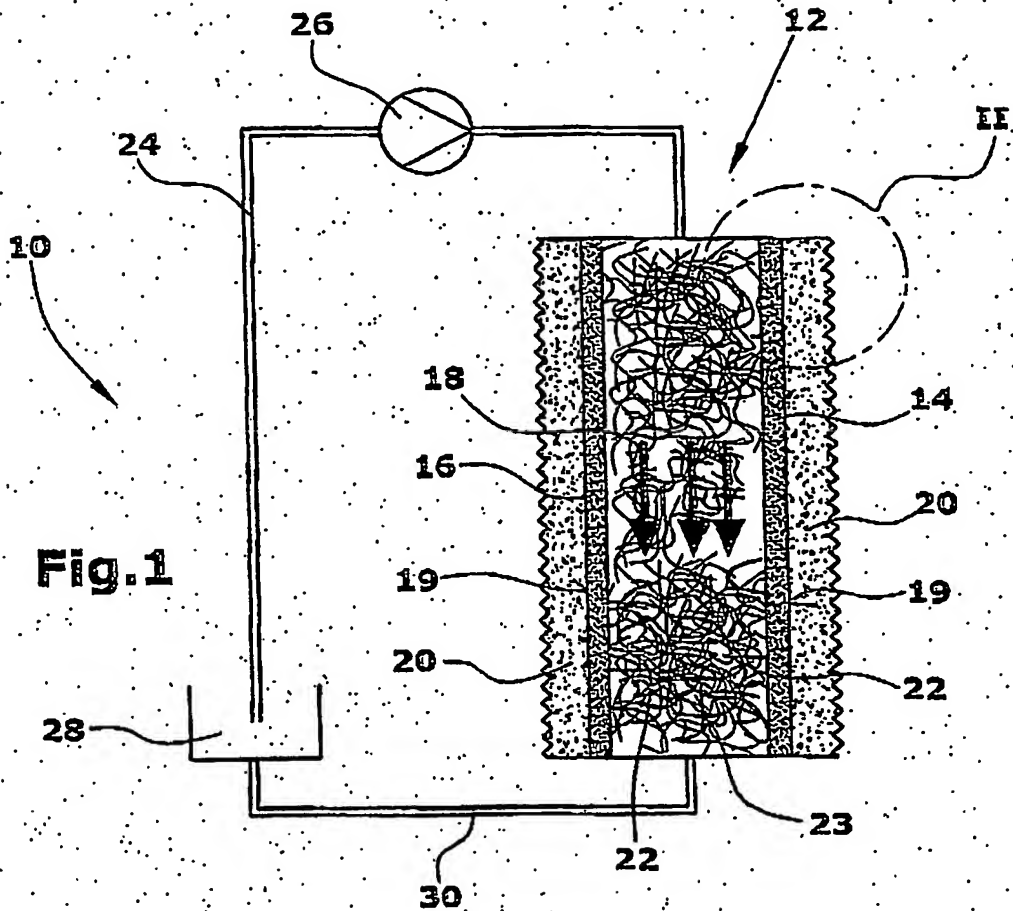
### Verfahren und Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen sowie Biosensor mit kultivierten eukaryotischen Mikroorganismen

Bei dem Verfahren und der Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen wird ein perforierter Träger (14) mit einer ersten Hauptfläche (19) und einer zweiten Hauptfläche (22), der für eukaryotische Mikroorganismen (20) im wesentlichen undurchlässig ist, bereitgestellt und die Mikroorganismen (20) werden auf die erste Hauptfläche (19) appliziert. Die zweite Hauptfläche (22) wird mit einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film versehen und die wässrige Lösung (18) tritt im wesentlichen mittels Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (22) an die erste Hauptfläche (19). Die erste Hauptfläche (19) wird dadurch mit wässriger Lösung (18) versorgt und die applizierten Mikroorganismen (20) wachsen auf der ersten Hauptfläche (19).

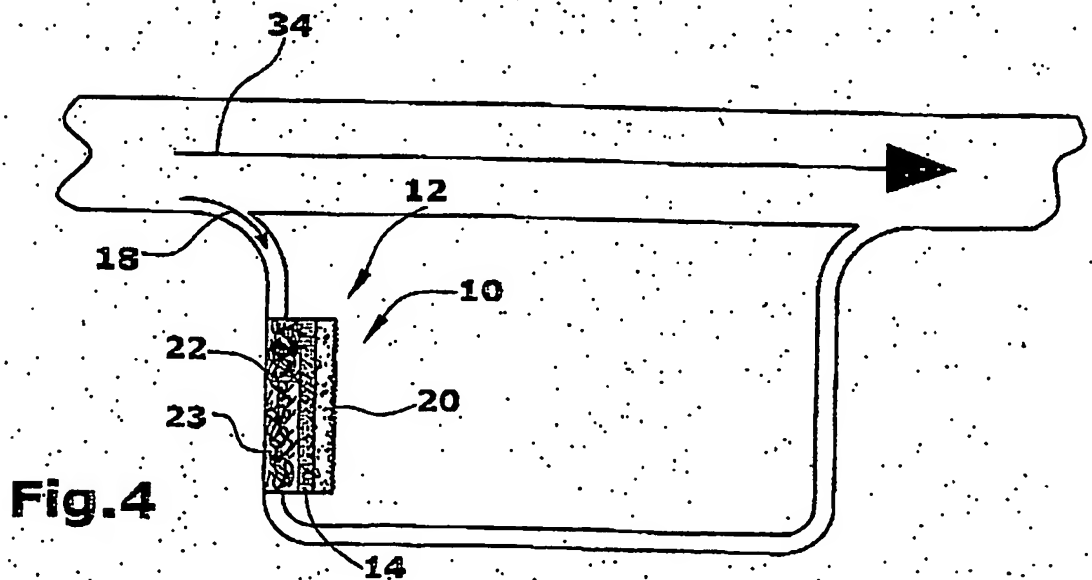
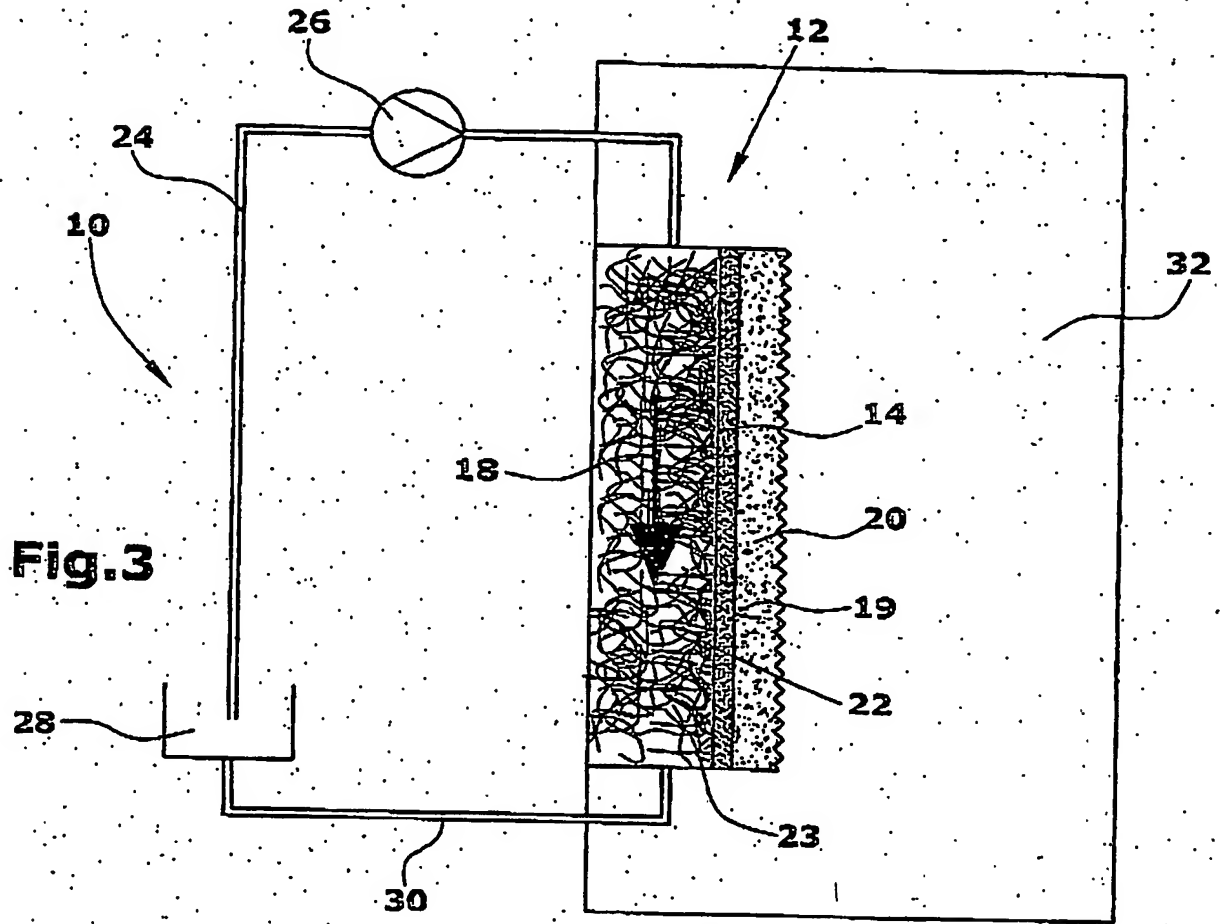
(Fig. 1)



- 1/2 -



- 2/2 -



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**